

ヒト脳腫瘍内リンパ球のsubsetの解析とEBウィルスによる樹立リンパ芽球様細胞の抗脳腫瘍抗体産生能の検討

著者	新海 準二
号	919
発行年	1984
URL	http://hdl.handle.net/10097/25381

氏 名（本籍）	しん 新	がい 海	じゅん 準	じ 二
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医 博 第	9 1 9	号	
学位授与年月日	昭 和	5 9	年 3 月 2 7 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程) 外科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	ヒト脳腫瘍内リンパ球の subset の解析と EB ウィ ルスによる樹立リンパ芽球様細胞の抗脳腫瘍抗体 産生能の検討			

(主 査)

論文審査委員 教授 鈴木 二郎 教授 佐藤 寿雄

教授 橘 武彦

論文内容要旨

脳腫瘍関連抗原に対するマウス単クローン性抗体の報告は数多いが、治療への応用としては、ヒト由来の単クローン性抗体が望ましいと考えられる。しかし現在の所、悪性腫瘍に対するヒト単クローン性抗体の樹立は困難である。その理由の1つに、腫瘍抗原に対するメモリーを保有するB細胞の採取が困難なことが挙げられる。

我々は脳腫瘍内リンパ球の subset を検討するとともに、EBウィルスによってトランスフォームされたリンパ芽球様細胞の、自家および同種腫瘍に対する抗体産生能を検討した。

まず、患者血清中の抗体価を、培養自家脳腫瘍を標的細胞として検討した結果、IA法では3例のグリオーマ中2例で、アビジンビオチン膜蛍光抗体法では、2例（グリオーマ1例、メラノーマ脳転移1例）全例で、自家脳腫瘍との結合を認めた。同一症例（GT14）での抗体価は、IA法で16倍、アビジンビオチン膜蛍光抗体法で10倍であり、特に差は認めなかった。

12例の手術より得られた腫瘍塊を細切し、0.02%コラゲナーゼおよびDNase $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理し、Sodium-Metrizoate/Ficoll にのせ、400gで20分間遠心し、その中間層を集め、Gey溶液で赤血球を破壊させ、pH 4.0の酢酸緩衝液で処理しFcレセプターを介して結合した免疫グロブリンを除いた、腫瘍細胞リンパ球浮遊液に対して、蛍光抗体法によるリンパ球マーカー陽性率を検討した結果、OKT3陽性のT細胞を検討した6例では、その比率が0-7.4%であるのに対して、sIg陽性のB細胞は6.8-42.2%であった。症例毎の差は認めるものの、それぞれの症例においては、いずれもsIg陽性のB細胞が優位であり、末梢血リンパ球のT細胞、B細胞のポピュレーションとは著しく異なる様相を呈していた。また、sIgクラス別に分けると、sIgGの最も高いものが12例中9例であり、sIgG陽性B細胞の多い傾向が認められた。

一方、腫瘍細胞リンパ球浮遊液に、EBウィルスを感染させ、24ウェルマルチディッシュにて炭酸ガス培養器で培養し、リンパ芽球様細胞樹立能を検討した結果、17例中、リンパ芽球様細胞が樹立されたものが5例、一時的に増殖を認めたが、不安定で樹立株がえられなかったものが4例であった。腫瘍内リンパ球の比率あるいは腫瘍の組織学的特徴と、そのトランスフォーメーション効率の間には、特に相関は認めなかった。

リンパ芽球様細胞は、プレートに生着していた腫瘍細胞の表面に付着しながら増殖を続け、培養開始後4週から8週目には、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgM産生を認めた。安定した樹立株が得られたGT23-Lでは、EBウィルスに感染させた24個のウェルのうち、8個のウェルでリンパ芽球様細胞を認め、うち6個のウェルでIgMの分泌を認めた。このうち4個のウェルで樹立株を得たが、これらは培養開始後4週から8週の間、細胞数が増加するにつれ、IgM量も20

倍から40倍に増加していた。

これらのリンパ芽球様細胞の産生する抗体の自家脳腫瘍との結合を、I A法および、アビジン-ビオチン膜蛍光抗体法で検討したものは3例（G T 19-L, G T 23-L, M E L 2-L）であるが、3例全例で、計17細胞株の培養上清で、自家脳腫瘍との結合を認めた。

このうち、同種脳腫瘍細胞との交叉性を、Indirect binding assay で検討したG T 23-Lの4細胞株（A 4, A 5, B 1, C 5）のうち、A 4では4種類の同種グリオーマ細胞株（H B T 5, G T 14, M G 178, Marcus）のうち全例のグリオーマとの、A 5, B 1, C 5では2～3種類のグリオーマ細胞株との結合を認めた。これらは、膀胱癌細胞（P K 9）胃癌細胞（K A T O III, M 74）とも結合し、交叉性があることを推測させたが、胎児肺腺維芽細胞、（H E L-5）、血管内皮細胞（H U V-E C）との結合は認めなかった。

自家脳腫瘍との結合を検討しえなかったG T 25-Lでも、G T 23-Lと同様に、膀胱癌細胞、胃癌細胞との結合を認めた。

更に我々は、単クローン性抗体を得るために限界希釈法によってクローニングを試みたが、単クローン性リンパ芽球様細胞を得ることはできなかった。従って、その特異性を論ずる上で、更に検討を重ねる必要がある。

いずれにせよ、腫瘍内リンパ球はB細胞が優位であり、T細胞が少数であることを認め、このリンパ球をE Bウィルスによってトランスフォームすることにより、脳腫瘍関連抗原に対する抗体産生を、in vitroで認めた。これらの抗体は、自家腫瘍だけでなく、同種グリオーマ、膀胱癌細胞、胃癌細胞とも結合したが、興味深いことに、正常線維芽細胞、内皮細胞とは結合しなかった。

腫瘍内リンパ球は、ヒト単クローン性抗体へのアプローチとして、腫瘍関連抗原に対するメモリーB細胞の採取方法として、十分貢献できるものと思われた。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、ヒト脳腫瘍内リンパ球の subset と、その抗脳腫瘍抗体産生能を検討したものである。

悪性腫瘍に対するヒト単クローン性抗体は、主に細胞融合を応用したハイブリドーマ法が、現在まで主として研究されてきた。しかし、ハイブリドーマのパートナーとなる適当なミエローマ細胞株が少ないこと、腫瘍抗原に対するメモリーBリンパ球の採取が困難であること、また作製された抗体に対する autochthonous なスクリーニングが困難であること、等様々な問題点があり、ヒト単クローン性抗体の報告は少ない。

そこで著者は、メモリーBリンパ球源として、腫瘍内リンパ球に着目し、抗体産生能を保有するリンパ球株の樹立法として、EBウイルスによるトランスフォームを行った。さらに、抗体産生能をスクリーニングする方法として、培養自家脳腫瘍細胞を用いた autochthonous な実験系を採用し、検討している。

この結果、脳腫瘍内リンパ球の subpopulation として、Bリンパ球が優位であり、メラノーマ等の悪性腫瘍の腫瘍内リンパ球とは著しく異なっていることを認めた。さらに、脳腫瘍内リンパ球がEBウイルスで容易にトランスフォームされ、活発な抗体産生を営むが、このリンパ芽球様細胞の産生する抗体は、自家脳腫瘍および同種腫瘍との交叉性を認めたが正常線維芽細胞、血管内皮細胞との交叉性は認めなかったとしている。

本論文において、脳腫瘍内にBリンパ球が優位であることは、他の悪性腫瘍では認められなかったことであり、極めて意義あるものと考えられる。また、従来のハイブリドーマ法に比べ、高率に、腫瘍関連抗原に対する抗体産生株が得られたことは、今後のヒト単クローン性抗体作製の上で、十分貢献しうるものと考えられる。

従って、これらの点から、本論文は学位授与に値するものと思われる。